

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22791916  
 研究課題名（和文）骨再生用ナノコーティングスキャフォールドを用いた歯周組織再生療法の開発  
 研究課題名（英文）Periodontal tissue engineering using osteoconductive scaffold coated by nano bioceramics.  
 研究代表者  
 宮治 裕史（MIYAJI HIROFUMI）  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号：50372256

## 研究成果の概要（和文）：

ナノバイオセラミクスは高い生体活性を有する。そこでナノバイオセラミクスコーティングスキャフォールドと増殖因子を併用する新しい再生療法の開発を行った。リン酸カルシウムのナノ粒子でコーティングされたコラーゲンスキャフォールドは、スペースメイキング効果、生体親和性、内部への細胞侵入性が高く、線維芽細胞増殖因子（FGF2）との併用を行ったところ骨増生効果や歯周組織再生効果が促進された。FGF2/ナノコーティングスキャフォールドが骨、歯周組織再生用デバイスとして応用可能であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Nanoparticle bioceramics have many bioactive effects. We prepared collagen scaffold coated by nano tricalcium phosphate (TCP) and growth factor and evaluated the effects on tissue engineering. Nano-TCP scaffold showed higher compressive strength, cyto-compatibility and tissue ingrowth. In histological evaluations, bone augmentation and periodontal tissue healing were stimulated by application of nano-TCP scaffold in combination with fibroblast growth factor-2 (FGF2). We concluded that FGF2/nano-TCP scaffold would be effective for bone and periodontal tissue engineering.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：バイオマテリアル，スキャフォールド，ナノ材料，リン酸カルシウム，線維芽細胞増殖因子（FGF2），ティッシュエンジニアリング，細胞・組織。

## 1. 研究開始当初の背景

重度歯周病の再生治療のため、新しいコンセプトを持った再生療法の開発が必要である。研究者はこれまでに、歯周組織再生のためのスキャフォールドとしてコラーゲンスポンジを用いてきた。しかし、コラーゲンスポンジ単独での骨再生量は十分ではなく、さらなる改良が必要であると考えられた。

近年、研究者はリン酸カルシウム(TCP)をナノ粒子化し、コラーゲンスポンジをコーティングする技術を確立した。骨基質の成分であるTCPを用いて表面加工を行うと骨再生効果が期待される。さらにナノ粒子は表面積が大きいことから、タンパク質吸着性、生体吸収性が向上する可能性が高く、ナノコーティングスキャフォールドは生体内でバイオアクティブであると考えられる。

線維芽細胞増殖因子(FGF2)は創傷治癒や骨芽細胞の増殖を促進できるタンパク質として知られており、FGF2をナノコーティングスキャフォールドに組み込むことで強力に骨増生を促進させる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) ナノコーティングスキャフォールドを作製して物性や生体親和性を評価

(2) ナノコーティングスキャフォールドをラットへ移植してイングロースや骨増生を評価

(3) ナノコーティングスキャフォールドをイヌ1壁性骨欠損へ移植して歯周組織治癒に及ぼす効果を検討

## 3. 研究の方法

(1) ナノコーティングスキャフォールドの作製と物性評価

$\beta$ -TCP (平均粒径: 2.3  $\mu\text{g}$ , 図 3-A) を Nanomizer にて粉砕, コール酸ナトリウムを分散剤として TCP 分散液を作製した。ナノ粒子の形態と粒径を分析した。

次に気孔率 96%のコラーゲンスポンジ (図 1-a) を TCP 分散液へ浸漬後, エタノール洗浄後に凍結乾燥してナノコーティングスキャフォールドとした (図 1-b)。

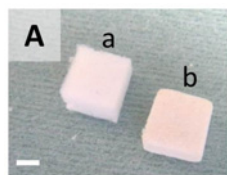


図 1 (a)コラーゲンスポンジ. (b)ナノコーティングスキャフォールド. Scale: 2mm.

スキャフォールドの表面および内部を観察, 気孔率, XRD, 圧縮強度を測定した。

(2) 細胞親和性の評価

ナノコーティングスキャフォールドおよびコラーゲンスポンジに骨芽細胞様 MC3T3-E1

細胞を播種して 1, 2 日目に proliferation assay を行った。また, 細胞形態を観察した。

(3) ラット背部皮下への移植

ナノコーティングスキャフォールドをラットの背部皮下へ移植して, 10 日目における生体親和性を観察した。また, スキャフォールドへのイングロースを評価するために, スキャフォールドを摘出して DNA 量を計測した。

(4) 骨増生および吸収性評価

ラット頭蓋骨上へナノコーティングスキャフォールドと FGF2 添加 (loading dose; 50  $\mu\text{g}$ ) スキャフォールドを移植して, 10, 35 日目の組織反応を観察した。35 日目の組織標本から骨形成量とスキャフォールドの吸収量を計測した。

(5) 歯周組織への移植

イヌ歯周組織 1 壁性骨欠損部にナノコーティングスキャフォールドを埋植して, 10 日目の生体親和性, 細胞侵入性, スペースメイキング効果を比較評価した。

## 4. 研究成果

(1) ナノコーティングスキャフォールドの作製と物性評価

ナノ粒子化した TCP の粒径は 20~500 nm に分布, 平均粒径は 127 nm であった (図 2, 3)。

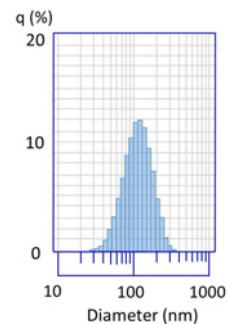


図 2 ナノ TCP の粒度分布

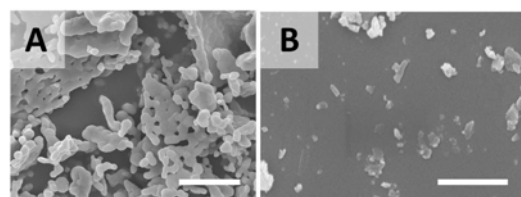


図 3 A: TCP B: ナノ TCP. Scale: 10 $\mu\text{m}$  (A), 1 $\mu\text{m}$  (B)

気孔率は 95%以上で, 高気孔率を維持していた。コラーゲンスポンジの表面にナノ TCP 粒子が付着しており, スポンジ内部にも同様に付着していた。ナノコーティングスキャフォールドの XRD パターンは  $\beta$ -TCP のパターンと一致していた (図 4)。圧縮強度はコラーゲンスポンジの約 2 倍を示した (図 5)。

(2) 細胞親和性の評価

ナノコーティングスキャフォールドへ播種

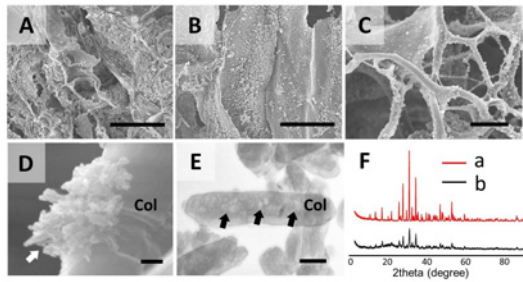


図4 A: ナノコーティングスキャフォールドのSEM像. B: スキャフォールド内部. C: スキャフォールドの拡大像, D: ナノ粒子 (矢印) の拡大像. E: TEM像. F: XRD. Scale bars: 100  $\mu$ m (A, B), 10  $\mu$ m (C), 200 nm (D), 100 nm (E). Col: コラーゲンスポンジ.

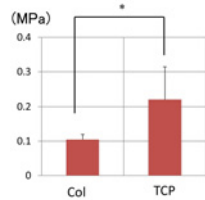


図5 50%圧縮強度. Col: コラーゲンスポンジ, TCP: ナノコーティングスキャフォールド. \* P<0.05

した MC3T3-E1 細胞は良好に増殖, コラーゲンスポンジよりも有意に高い値を示した. ナノコーティングされたコラーゲン表面には細胞が付着伸展しており, 良好な細胞親和性が示された (図6).

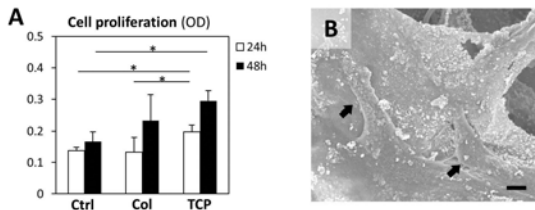


図6 A: CCK-8 アッセイ. B: ナノコーティングスキャフォールドに付着した細胞のSEM像 (矢印). Scale: 10  $\mu$ m

### (3) ラット背部皮下への移植

10 日目においてナノコーティングスキャフォールドでは細胞のイングロースを認め, マクロファージや血管新生を認めた. 一方, コラーゲンスポンジでは細胞のイングロースは少なく, 圧縮されていた (図7).

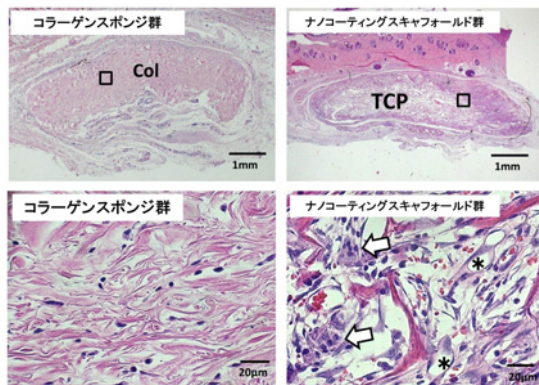


図7 ラット背部皮下の組織像. マクロファージ (矢印), 新生血管 (\*).

抽出した資料の DNA 量を計測したところ, ナノコーティングスキャフォールドの値はコラーゲンスポンジに比較して有意に高く, また, コーティング濃度依存性に増加した (図8).

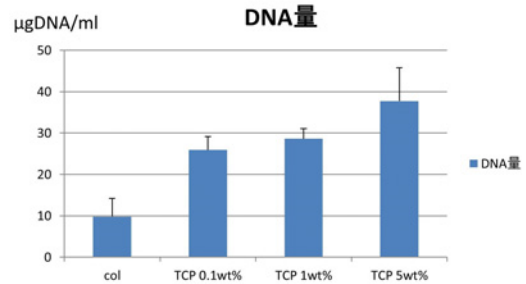


図8 DNA量. TCPはColに比較して有意差あり.

### (4) 骨増生および吸収性評価

10 日目において背部皮下と同様にナノコーティングスポンジでは細胞のイングロースを認めた. TCP の凝集塊の周囲にマクロファージ様細胞が出現していた. コラーゲンスポンジでは細胞のイングロースは少なく, 圧縮されていた. FGF2 を併用すると骨増生が促進された (図9).

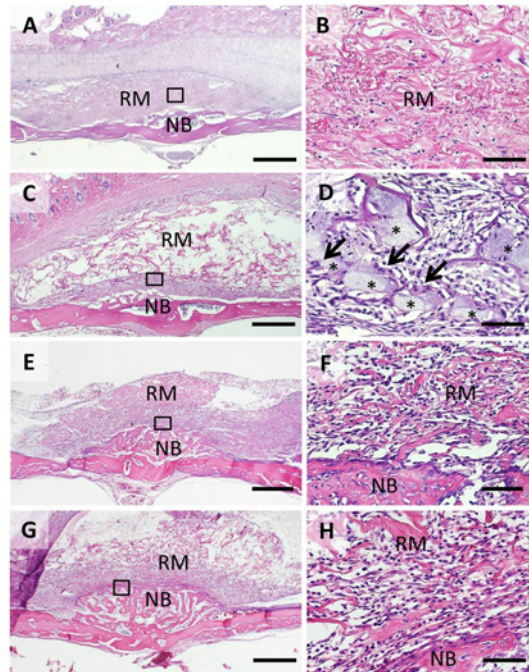


図9 A, B: コラーゲンスポンジ. C, D: ナノコーティングスキャフォールド. E, F: FGF2 添加スポンジ. G, H: FGF2 添加ナノコーティングスキャフォールド. Scale bars: 1 mm (A, C, E, G), 100  $\mu$ m (B, D, F, H). RM: 残存試料, NB: 新生骨. マクロファージ (矢印), TCP 粒子 (\*).

35 日目においてナノコーティングスポンジの吸収性はコラーゲンスポンジに比較して良好であった. FGF2 との併用で有意な骨増生を認めた (図10).

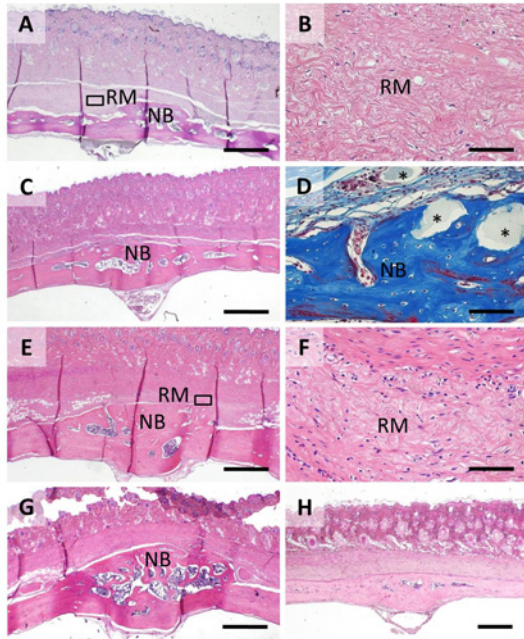


図10 A, B: コラーゲンスポンジ. C, D: ナノコーティングスキャフォールド. E, F: FGF2 添加スポンジ. G: FGF2 添加ナノコーティングスキャフォールド. H: 移植なし. Scale bars: 1 mm (A, C, E, G, H), 100 μm (B, D, F).

### (5) 歯周組織への移植

歯周組織欠損への移植において、スキャフォールドの移植部位は歯肉退縮が少なく、十分なスペースメイキング効果を認めた (図 12, 13). スキャフォールドの残存面積を組織学的に計測するとコラーゲンスポンジの約 2 倍であった (図 14).



図12 イヌ口腔内写真. 矢印は移植部位を示す.

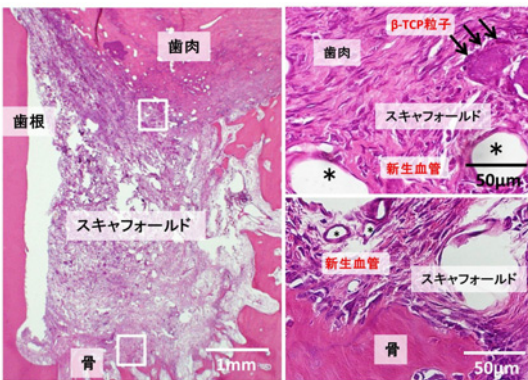


図13 ナノコーティングスキャフォールド移植部位の組織像.

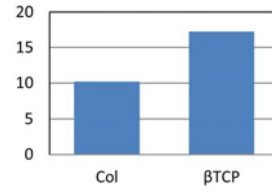


図14 残存試料面積

また、FGF2 の添加によって、歯槽骨の新生が活発に認められた (図 15).

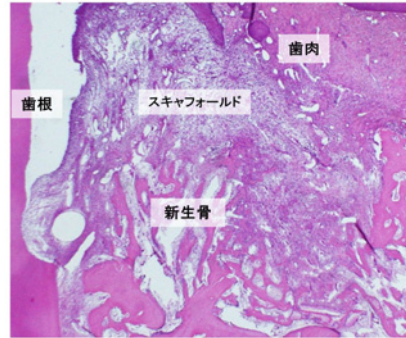


図15 FGF 添加ナノコーティングスキャフォールド移植部位の組織像.

以上の結果からナノコーティングスキャフォールドはバイオアクティブであり、FGF2 との親和性も高いことが明らかになった. FGF2/ナノコーティングスキャフォールドが骨、歯周組織再生用デバイスとして応用可能であると考えられた.

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. A Ibara, H Miyaji, B Fugetsu et al.: Preparation and characterization of collagen scaffold coated with a nano-β-TCP dispersion for bone tissue engineering. Hokkaido J Dent Sci, 査読有, in press, 2013.
2. H Miyaji, H Yokoyama, Y Kosen et al.: Bone augmentation in rat by highly porous β-TCP scaffolds with different open-cell sizes in combination with fibroblast growth factor-2. J Oral Tissue Engin, 査読有, 10:172-181, 2013.
3. Y Kosen, H Miyaji, A Kato, T Sugaya, M Kawanami: Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs. J Periodont Res, 査読有, 47: 626-634, 2012.  
DOI:10.1111/j.1600-0765.2012.01475.

4. H Miyaji, T Sugaya, K Ibe, R Ishizuka, K Tokunaga, M Kawanami: Influence of root surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 on periodontal wound healing in beagle dogs. *J Oral Tissue Engin*, 査読有, 8: 173-180, 2011.  
<http://dx.doi.org/10.11223/jarde.8.173>
  5. 宮治裕史, 川浪雅光: 最新の歯学 歯周組織再生への新しいアプローチ. *北海道歯誌*, 査読有, 31: 121-123, 2010.  
<http://hdl.handle.net/2115/45820>
  6. N Kobayashi, H Miyaji, T Sugaya, M Kawanami: Bone augmentation by implantation of an FGF2-loaded collagen gel-sponge composite scaffold. *J Oral Tissue Engin*, 査読有, 8: 91-101, 2010.  
<http://dx.doi.org/10.11223/jarde.8.91>
  7. K Inoue, H Miyaji, T Sugaya, M Kawanami: Ectopic bone induction by BMP-loaded collagen scaffold and bone marrow stromal cell sheet. *J Oral Tissue Engin*, 査読有, 8: 19-29, 2010.  
<http://dx.doi.org/10.11223/jarde.8.19>
  8. A Kato, H Miyaji, Y Kosen et al.: Periodontal healing by implantation of collagen hydrogel-sponge composite in one-wall infrabony defects in beagle dogs. *J Oral Tissue Engin*, 査読有, 8: 39-46, 2010.  
<http://dx.doi.org/10.11223/jarde.8.39>
  9. H Miyaji, T Sugaya, K Ibe, R Ishizuka, K Tokunaga, M Kawanami: Root Surface Conditioning with Bone Morphogenetic Protein-2 Facilitates Cementum-like Tissue Deposition in Beagle Dogs. *J Periodont Res*, 査読有, 45: 658-663, 2010.  
doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01281.x. Epub 2010 Jun 10.
- [学会発表] (計22件)
1. 宮治裕史, 他: 異なる濃度のナノβ-TCP分散液でコーティングしたコラーゲンスキャフォールドの特性評価. 日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会 (第138回), 福岡国際会議場 (福岡県), 平成25年6月27-28日.
  2. 西田絵利香, 宮治裕史, 他: 酸化グラフェンおよびグラフェンによる歯根象牙質コーティングとタンパク吸着性の評価. 第56回春季日本歯周病学会学術大会, タワーホール船堀 (東京都), 平成25年5月31日-6月1日.
  3. 百瀬起人, 宮治裕史, 他: FGF含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドの根分岐部 class II 骨欠損への応用. 第56回春季日本歯周病学会学術大会, タワーホール船堀 (東京都), 平成25年5月31日-6月1日.
  4. 小川幸佑, 宮治裕史, 他: ナノβ-TCP/コラーゲンスキャフォールドのイヌ歯周組織欠損モデルへの応用. 第56回春季日本歯周病学会学術大会, タワーホール船堀 (東京都), 平成25年5月31日-6月1日.
  5. 吉田 崇, 宮治裕史, 他: 高気孔性PLGA/β-TCP スキャフォールドの骨増生效果. 第56回春季日本歯周病学会学術大会, タワーホール船堀 (東京都), 平成25年5月31日-6月1日.
  6. 宮治裕史, 他: カーボンナノチューブコーティングチタンの生体応用. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012, 仙台国際センター (仙台市), 平成24年11月26-27日.
  7. 吉田 崇, 宮治裕史, 他: プラスチックコーティングした高気孔性β-TCP スキャフォールドの物性と生体親和性の評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012, 仙台国際センター (仙台市), 平成24年11月26-27日.
  8. 金山和泉, 宮治裕史, 他: グラフェンと酸化グラフェンが培養骨芽細胞に及ぼす影響. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012, 仙台国際センター (仙台市), 平成24年11月26-27日.
  9. 田中佐織, 宮治裕史, 他: コンポジットレジンへのカーボンナノチューブコーティング技術の応用. 日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会 (第137回), 広島国際会議場 (広島市), 平成24年11月22-23日.
  10. 井原朝子, 宮治裕史, 他: ナノβ-TCP/コラーゲンスキャフォールドの作製と骨再生療法への応用. 日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会 (第137回), 広島国際会議場 (広島市), 平成24年11月22-23日.
  11. 西田絵利香, 宮治裕史, 他: グラフェンおよび酸化グラフェンによる象牙質コーティング法の検討. 日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会 (第137回), 広島国際会議場 (広島市), 平成24年11月22-23日.
  12. A Kato, H Miyaji et al.: The bone-forming effect of nano-β-TCP/collagen scaffold. 98<sup>th</sup> annual meeting of AAP in collaboration with

- JSP, Los Angeles Convention Center (USA), Sept 29-Oct 2, 2012.
13. E Nishida, H Miyaji et al.: Preparation and biological evaluation of titanium coated with CNT-net. 98<sup>th</sup> annual meeting of AAP in collaboration with JSP, Los Angeles Convention Center (USA), Sept 29-Oct 2, 2012.
  14. 宮治裕史, 他: 高気孔性  $\beta$ -TCP スキャフォールドの作製と評価. 第 55 回春季日本歯周病学会学術大会, 札幌コンベンションセンター (札幌市), 平成 24 年 5 月 18-19 日.
  15. 井原朝子, 宮治裕史, 他: ナノ  $\beta$ -TCP 配合コーラゲンスキャフォールドの作製と評価. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都府), 平成 23 年 11 月 21-22 日.
  16. 宮治裕史, 他: 高気孔性  $\beta$ -TCP フォームへの FGF2 添加による骨新生効果. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都府), 平成 23 年 11 月 21-22 日.
  17. 加藤昭人, 宮治裕史, 他: BMP の根面塗布とコーラゲンハイドロゲル-スポンジ複合体の併用による歯周組織再生. 第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会, サンプオートホール高松 (香川県), 平成 23 年 9 月 18-19 日.
  18. 宮治裕史, 他: ゼラチンコーティング  $\beta$ -TCP フォームの開発と骨再生療法への応用. 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, グランドプリンスホテル広島 (広島県), 平成 22 年 11 月 29-30 日.
  19. A Kato, H Miyaji et al.: Periodontal regeneration following BMP-root conditioning and collagen scaffold implantation. 88<sup>th</sup> General Session of the IADR, International Convention Centre (Spain), July14-17, 2010.
  20. H Miyaji et al.: Effect of  $\beta$ -TCP foam cell size on osteoinduction using FGF2. 88<sup>th</sup> General Session of the IADR, International Convention Centre (Spain), July14-17, 2010.
  21. 光銭裕太, 宮治裕史, 他: 根分岐部 class II 骨欠損におけるコーラゲンハイドロゲル-スポンジ複合体による歯周組織再生. 第 53 回日本歯周病学会春季学術大会, 盛岡市民文化ホール (盛岡市), 平成 22 年 5 月 14-15 日.
  22. 加藤昭人, 宮治裕史, 光銭裕太ら: 1 壁性骨欠損におけるコーラゲンハイドロゲル-スポンジ複合体による歯周組織再生. 第 53 回日本歯周病学会春季学術大会, 盛岡市民文化ホール (盛岡市), 平成 22 年 5 月 14-15 日.

[産業財産権]  
○取得状況 (計 1 件)

名称: 骨再生材料及びその製造方法  
発明者: 宮治裕史, 川浪雅光, 西村浩之  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特開 2012-16517  
取得年月日: 平成 24 年 1 月 26 日  
国内外の別: 国内

[その他]

1. ホームページ  
<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/tissue-engineering.html>
2. アウトリーチ活動  
平成 24 年度北大病院実験教室 (大谷高校 8 名). 札幌, 平成 24 年 11 月 18 日.
6. 研究組織
  - (1) 研究代表者  
宮治 裕史 (MIYAJI HIROFUMI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 50372256
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
なし
  - (4) 研究協力者  
古月 文志 (FUGETSU BUNSHI)  
北海道大学  
・地球環境科学研究科 (研究院)・教授  
研究者番号: 40281844  
  
田中 佐織 (TANAKA SAORI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号: 90344522  
  
加藤 昭人 (KATO AKIHITO)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号: 40507571